

(19) Organisation Mondiale de la Propriété  
Intellectuelle  
Bureau international



Rec'd PCT/PTO

541 490  
07 JUL 2005

10/541490



(43) Date de la publication internationale  
19 août 2004 (19.08.2004)

PCT

(10) Numéro de publication internationale  
WO 2004/069804 A1

(51) Classification internationale des brevets<sup>7</sup> :

C07D 219/02, C12Q 1/04, 1/37

(21) Numéro de la demande internationale :

PCT/FR2004/050031

(22) Date de dépôt international :

26 janvier 2004 (26.01.2004)

(25) Langue de dépôt :

français

(26) Langue de publication :

français

(30) Données relatives à la priorité :

FR0300953

29 janvier 2003 (29.01.2003)

FR

(71) Déposant (pour tous les États désignés sauf US) :  
BIOMERIEUX [FR/FR]; Chemin de l'Orme, F-69280  
Marcy l'Etoile (FR).

(72) Inventeurs; et

(75) Inventeurs/Déposants (pour US seulement) : JAMES,  
Arthur [GB/GB]; The Timbers, Hillside Road East,  
Rothbury Northumberland NE65 7PT (GB). RIGBY, An-  
nette [GB/GB]; Prospect House, Comb Hill, Haltwhistle  
Northumberland NE49 NS (GB).

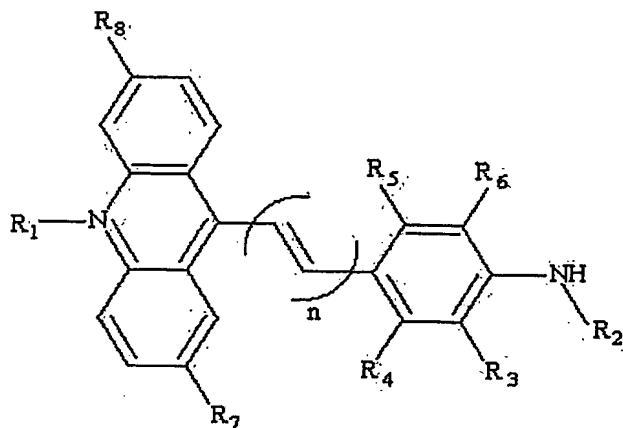
(74) Mandataire : BITAUD, Valérie; Chemin de l'Orme,  
F-69280 Marcy l'Etoile (FR).

(81) États désignés (sauf indication contraire, pour tout titre de  
protection nationale disponible) : AE, AG, AL, AM, AT,

[Suite sur la page suivante]

(54) Title: ENZYME SUBSTRATES, CULTURE MEDIA CONTAINING SAME AND USE THEREOF IN ORDER TO DETECT AMINOPEPTIDASE ACTIVITY AND/OR DIFFERENTIATE GRAM-POSITIVE BACTERIA FROM GRAM-NEGATIVE BACTERIA

(54) Titre : SUBSTRATS ENZYMATIQUES, MILIEUX DE CULTURE LES CONTENANT, UTILISATION POUR DETECTER UNE ACTIVITE AMINOPEPTIDASE ET/OU DIFFERENCIER DES BACTERIES A GRAM POSITIFS DES BACTERIES A GRAM NEGATIFS



(I)

(57) Abstract: The invention relates to novel chromogenic enzyme substrates which are used to detect aminopeptidase activity in micro-organisms or to determine whether at least one bacterium belongs to the Gram-positive group or the Gram-negative group according to the colour thereof. The invention also relates to culture media containing such substrates, the use of said substrates or media for the detection of aminopeptidase activities and/or the differentiation of Gram-positive bacteria in relation to Gram-negative bacteria and use methods thereof. The aforementioned novel substrates have the following formula, wherein: R<sub>1</sub> is nothing or an alkyl, allyl, aryl group; R<sub>2</sub> is formed by at least one amino acid, preferably alanine; R<sub>3</sub>, R<sub>4</sub>, R<sub>5</sub> and R<sub>6</sub> are formed independently of one another by H- or -O-alkyl, preferably -O-CH<sub>3</sub>; R<sub>7</sub> is formed by H, -O-CH<sub>3</sub>, alkyl or halogen; R<sub>8</sub> is formed by H or Cl; and n is an integer corresponding to 0 or 1. The invention is particularly suitable for use in the field of diagnostics.

(57) Abrégé : La présente invention concerne de nouveaux substrats chromogéniques enzymatiques pour la détection chez des micro-organismes d'une activité aminopeptidase ou pour définir l'appartenance d'au moins une bactérie au groupe des Gram positifs ou des Gram négatifs selon sa coloration. L'invention concerne également des milieux de culture contenant de tels substrats, l'utilisation des substrats ou des milieux pour la détection d'activités aminopeptidases et/ou la différenciation de bactéries à Gram positif par rapport à des bactéries à Gram négatif et des procédés d'utilisation. Ces nouveaux substrats ont la formule suivante dans laquelle, R<sub>1</sub> est rien ou un groupement alkyle, allyle, aryle, R<sub>2</sub> est constitué par au moins un acide aminé, préférentiellement alanine, R<sub>3</sub>, R<sub>4</sub>, R<sub>5</sub> et R<sub>6</sub> sont constitués indépendamment l'un de l'autre par H- ou -O-alkyle, préférentiellement -O-CH<sub>3</sub>, et R<sub>7</sub> est constitué par H, -O-CH<sub>3</sub>, alkyle ou halogène, R<sub>8</sub> est constitué par H ou Cl, et n est un chiffre entier correspondant à 0 ou 1. L'invention trouve une application préférentielle dans le domaine du diagnostic.



AU, AZ, BA, BB, BG, BR, BW, BY, BZ, CA, CH, CN, CO, CR, CU, CZ, DE, DK, DM, DZ, EC, EE, EG, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, HR, HU, ID, IL, IN, IS, JP, KE, KG, KP, KR, KZ, LC, LK, LR, LS, LT, LU, LV, MA, MD, MG, MK, MN, MW, MX, MZ, NA, NI, NO, NZ, OM, PG, PH, PL, PT, RO, RU, SC, SD, SE, SG, SK, SL, SY, TJ, TM, TN, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VC, VN, YU, ZA, ZM, ZW.

- (84) États désignés (sauf indication contraire, pour tout titre de protection régionale disponible) : ARIPO (BW, GH, GM, KE, LS, MW, MZ, SD, SL, SZ, TZ, UG, ZM, ZW), eurasién (AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TJ, TM), européen (AT, BE, BG, CH, CY, CZ, DE, DK, EE, ES, FI, FR, GB, GR, HU, IE, IT, LU, MC, NL, PT, RO, SE, SI, SK, TR), OAPI (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GQ, GW, ML, MR, NE, SN, TD, TG).

**Déclaration en vertu de la règle 4.17 :**

- *relative à la qualité d'inventeur (règle 4.17.iv)) pour US seulement*

**Publiée :**

- *avec rapport de recherche internationale*  
— *avant l'expiration du délai prévu pour la modification des revendications, sera republiée si des modifications sont reçues*

*En ce qui concerne les codes à deux lettres et autres abréviations, se référer aux "Notes explicatives relatives aux codes et abréviations" figurant au début de chaque numéro ordinaire de la Gazette du PCT.*

SUBSTRATS ENZYMATIQUES, MILIEUX DE CULTURE LES CONTENANT, UTILISATION POUR  
DETECTER UNE ACTIVITE AMINOPEPTIDASE ET/OU DIFFERENCIER DES BACTERIES A GRAM  
POSITIFS DES BACTERIES A GRAM NEGATIFS

La présente invention concerne de nouveaux substrats enzymatiques chromogènes  
5 pour la détection d'activité aminopeptidase. Ces substrats sont utilisables dans les applications  
comportant une étape d'hydrolyse enzymatique produisant un signal physico-chimique  
notamment en microbiologie, biochimie, immunologie, biologie moléculaire, histologie, etc.  
L'invention concerne également des milieux de culture contenant de tels substrats, l'utilisation  
des substrats ou des milieux pour la détection d'activités aminopeptidases et/ou la  
10 différenciation de bactéries à Gram positif par rapport à des bactéries à Gram négatif et des  
procédés d'utilisation.

Comparativement aux substrats existants, la plupart fluorigènes, ces nouveaux  
substrats peuvent être utilisés notamment en milieux gélifiés pour la détection de micro-  
organismes car ils produisent une coloration ne diffusant pas dans le milieu réactionnel donc  
15 ~~concentrée~~ au niveau des colonies.

Des substrats chromogéniques enzymatiques pour la détection d'activité  
aminopeptidase ne diffusant pas sont décrits et déjà connus de l'état de la technique. Ainsi, de  
tels substrats sont couverts par les demandes de brevet WO-A-98/04735 et WO-A-  
99/38995 déposées par la Demanderesse. Néanmoins, ces substrats présentent différents  
20 inconvénients : leur synthèse est difficile, la pureté est réduite et les rendements faibles. De  
plus, pour une utilisation en milieux de culture, il faut définir une composition de milieu très  
précise pour observer une couleur. Aucun des autres substrats actuellement décrits ne peut  
être utilisé en milieux solides pour la détection de micro-organismes en cultures mixtes.

D'autre part, des molécules à base d'acridine sont connues. Elles sont utilisées pour :

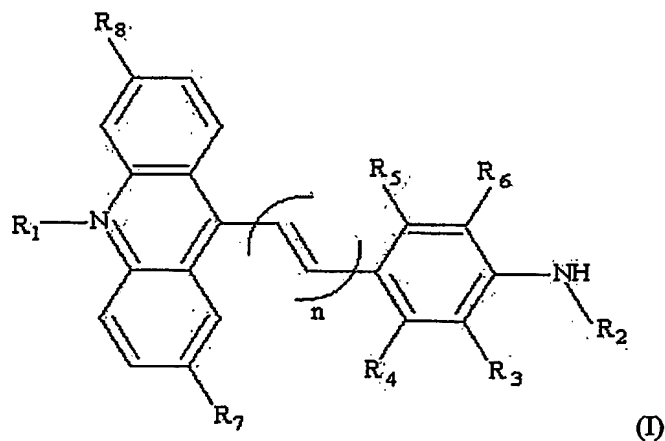
- 25
- leurs propriétés de colorant, voir par exemples Rapposch S. *et al.* J. Dairy Sci. 2000 Dec  
; 83 (12) : 2753-2758, ou bien par exemple Giorgio A. *et al.* Microbiologica 1989 Jan ;  
12 (1) : 97-100,
  - leurs propriétés chimiothérapeutiques, par exemple Costes N. *et al.* J. Med. Chem. 2000  
Jan 15 ; 43 (12) : 2395-2402, ou

- effectuer des intercalations dans l'ADN, par exemples Okwumabua O. *et al.* Res. Microbiol. 1992 Feb ; 143 (2) : 183-189 ou encore par exemple Schelhorn T. *et al.* Cell. Mol. Biol. 1992 Jul ; 38 (4) : 345-365.

Le brevet EP-B-0.270.946 propose des substrats enzymatiques chromogéniques à base d'acridinone, qui est un dérivé de l'acridine. Le radical, qui peut être clivé par une enzyme, est présent au niveau de la position 7 du groupement acridine. Sa structure ne permet la révélation que des activités enzymatiques suivantes : estérases et glycosidases.

Conformément à la présente invention, il est proposé de nouveaux substrats chromogéniques enzymatiques pour la détection chez des micro-organismes d'une activité aminopeptidase ou pour définir l'appartenance d'au moins une bactérie au groupe des Gram positifs ou des Gram négatifs selon sa coloration. L'invention concerne également des milieux de culture contenant de tels substrats, l'utilisation des substrats ou des milieux pour la détection d'activités aminopeptidases et/ou la différenciation de bactéries à Gram positif par rapport à des bactéries à Gram négatif et des procédés d'utilisation

A cet effet, la présente invention concerne des substrats chromogéniques enzymatiques pour la détection chez des micro-organismes d'une activité aminopeptidase ou pour définir l'appartenance d'au moins une bactérie au groupe des Gram positifs ou des Gram négatifs selon sa coloration. Ils ont la formule (I) suivante :



dans laquelle :

- R<sub>1</sub> est rien ou un groupement alkyle, allyle, aryle,

- $R_2$  est constitué par au moins un acide aminé, préférentiellement alanine,
- $R_3$ ,  $R_4$ ,  $R_5$  et  $R_6$  sont constitués indépendamment l'un de l'autre par H ou -O-alkyle, préférentiellement -O-CH<sub>3</sub>,
- $R_7$  est constitué par H, O-CH<sub>3</sub>, alkyle ou halogène,
- 5   •  $R_8$  est constitué par H ou Cl, et
- $n$  est un chiffre entier correspondant à 0 ou 1.

Selon l'invention, on entend notamment par aryle un noyau aromatique en C<sub>6</sub>-C<sub>10</sub>, notamment phényle, benzyle, 1-naphtyle ou 2-naphtyle.

On entend par alkyle un alkyle en C<sub>1</sub>-C<sub>6</sub>, à savoir un alkyle droit ou ramifié ayant de  
10   1 à 6 atomes de carbone. A titre d'exemple, on peut citer le méthyle, l'éthyle, le propyle, l'iso-propyle, le butyle, le t-butyle, le pentyle, l'iso-pentyle et l'hexyle.

Par atome d'halogène, on entend le chlore, le brome, l'iode et le fluor.

Les acides aminés utilisés dans l'invention sont tout acide aminé connu de l'homme du métier.

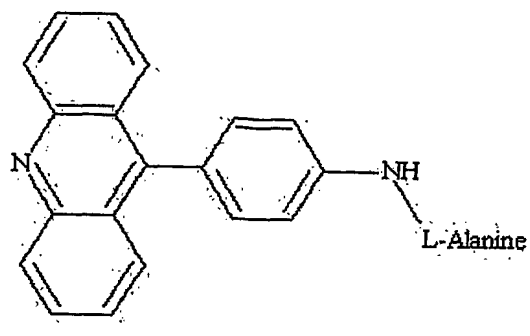
15   Par au moins un acide aminé, on entend un ou plusieurs acides aminés.

Selon un mode de réalisation de l'invention,  $R_2$  représente un acide aminé ou un peptide ayant au plus 10 acides aminés dans lequel les acides aminés sont identiques ou différents. De préférence, pour une question de coût du substrat, A représente un acide aminé ou un peptide ayant au plus 4 acides aminés dans lequel les acides aminés sont identiques ou  
20   différents, de préférence identiques.

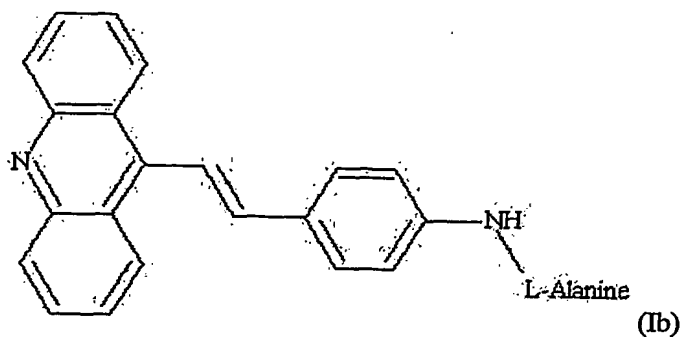
Le ou les acides aminés  $R_2$  peuvent être couplés à un agent de blocage, ce qui constitue un autre mode de réalisation de l'invention.

Ces agents de blocage comprennent tout agent de blocage connu de l'homme du métier qui est capable de protéger les amines. A titre d'exemple, on peut citer le t-butoxycarbonyle (N-tBOC), le 9-fluorényloxycarbonyle, un agent de solubilisation tel que le  
25   succinyle, ou bien un acide aminé non métabolisable, c'est-à-dire non naturel, tel que l'acide pipécolique.

Selon un mode de réalisation, le substrat a la formule (Ia) suivante :



ou il a la formule (Ib) suivante :

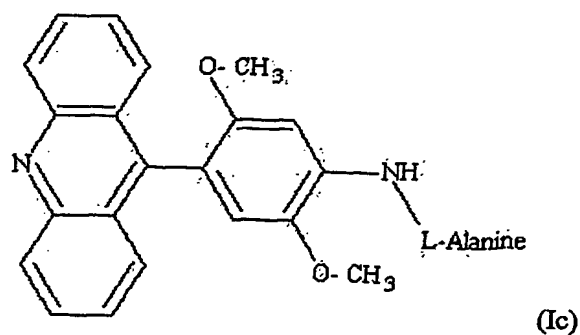


5 Selon un autre mode de réalisation, le substrat répond à la formule (I) ci-dessus dans laquelle  $R_1$  est un groupement méthyle ou allyle,

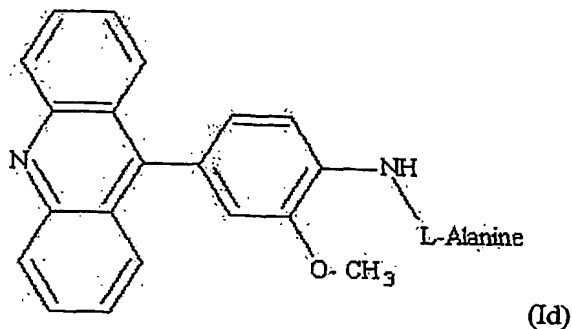
Selon encore un autre mode de réalisation, le substrat répond à la formule (I) ci-dessus dans laquelle  $R_1$  est un groupement alkyle, de préférence méthyle, ou un groupement allyle,  $R_2$  est au moins un acide aminé, éventuellement bloqué avec un agent de blocage, de

10 préférence au moins une alanine,  $R_3$ ,  $R_4$ ,  $R_5$ ,  $R_6$ ,  $R_7$  et  $R_8$  sont H, et n est 0 ou 1.

Selon encore un autre mode de réalisation, le substrat a la formule (Ic) suivante :



ou il a la formule (Id) suivante :



Les composés de l'invention peuvent être préparés en fonction de la valeur de  $n$ ,  
comme suit :

(1) Quand  $n=0$ , on met à réagir avec de l'acridine chlorhydrique appropriée ( $R_3$  est H ou Cl) avec de l'aniline appropriée ( $R_3$ ,  $R_4$ ,  $R_5$  et  $R_6$  étant tels que définis précédemment) et du soufre pour obtenir la 9-(4-aminophényl)acridine appropriée. Cette dernière est ensuite mise à réagir avec au moins un acide aminé couplé à un agent de blocage et le composé obtenu est éventuellement déprotégé pour séparer l'agent de blocage du composé de l'invention. Lorsqu'on veut obtenir un composé pour lequel l'azote en position 10 est quarternisé, on met à réagir le composé obtenu avec un  $XR_1$  dans laquelle  $X$  est un halogène et  $R_1$  est tel que défini précédemment, et

(2) Quand  $n=1$ , on met à réagir de la 9-méthylacridine, préparée selon la méthode de Campbell et al. (1958, *supra*), ou de la 9-chloroacridine, préparée selon la méthode de Lehmstedt et Schrader (Albert, 1966, *supra*), avec du nitrobenzaldéhyde approprié ( $R_3$ ,  $R_4$ ,  $R_5$  et  $R_6$  étant tels que définis précédemment) et du chlorure de zinc pour préparer de la 9-(4-nitrostyryl)acridine appropriée. Le groupement nitro est ensuite réduit soit par du chlorure d'étain (II) dans un mélange d'acétate d'éthyle et d'éthanol, soit par du borhydrate de sodium et de l'acétylacétonate de cuivre, pour obtenir la 9-(4-aminostyryl)acridine. Cette dernière est ensuite mise à réagir avec au moins un acide aminé couplé à un agent de blocage et le composé obtenu est éventuellement déprotégé pour séparer l'agent de blocage du composé de l'invention. Lorsqu'on veut obtenir un composé pour lequel l'azote en position 10 est

quaternisé, on met à réagir le composé obtenu avec un  $XR_1$  dans laquelle X est un halogène et  $R_1$  est tel que défini précédemment.

L'invention concerne également un milieu de culture utilisant au moins un substrat chromogénique enzymatique, tel que décrit ci-dessus, seul ou en combinaison avec au moins  
5 un autre substrat enzymatique spécifique d'une activité enzymatique différente d'une activité de celle détectée par le substrat selon l'invention.

En effet, lorsque des microorganismes exprimant une activité peptidase sont ensemencés dans un milieu réactionnel contenant les composés de l'invention, il se produit une coloration ne diffusant pas dans le milieu réactionnel, et donc concentrée au niveau des  
10 colonies.

Par milieu réactionnel selon l'invention, on entend un milieu permettant le développement d'au moins une activité enzymatique d'au moins un microorganisme.

Ce milieu réactionnel peut soit servir uniquement de milieu de révélation, soit de milieu de culture et de révélation. Dans le premier cas, la culture des microorganismes est effectuée  
15 avant ensemencement et, dans le deuxième cas, le milieu réactionnel constitue également le milieu de culture.

Le milieu réactionnel peut être solide, semi-solide ou liquide. Par milieu solide, on entend par exemple un milieu gélifié.

Préférentiellement, ce milieu est constitué par un milieu gélifié.

20 L'agar est l'agent gélifiant traditionnel en microbiologie pour la culture des microorganismes, mais il est possible d'utiliser de la gélatine ou de l'agarose. Un certain nombre de préparations sont disponibles dans le commerce, comme par exemple l'agar Columbia, la gélose Trypcase-soja, la gélose Mac Conkey, la gélose Sabouraud ou plus généralement celles décrites dans le Handbook of Microbiological Media (CRC Press).

25 La quantité d'agar dans le milieu réactionnel est de 2 à 40g/l et de préférence de 9 à 25g/l.

Les substrats enzymatiques de l'invention sont utilisables dans une large gamme de pH, notamment entre pH 5,5 et 10.

La concentration de substrat enzymatique de l'invention dans le milieu réactionnel est



comprise entre 0,025 et 1,0 g/l et, avantageusement, elle est de 0,3 g/l. En effet, à cette concentration de substrat, on obtient un meilleur contraste de coloration.

Le milieu réactionnel peut comprendre au moins un autre substrat spécifique d'une activité enzymatique différente de celle détectée par le substrat selon l'invention. L'hydrolyse enzymatique du ou des autres substrats génère un signal détectable, différent du signal détecté par le substrat de l'invention, comme par exemple des produits colorés ou fluorescents différents, pour permettre la mise en évidence comme la détection et/ou l'identification et/ou la quantification d'un ou plusieurs microorganismes.

A titre d'autre substrat spécifique, on peut utiliser tout autre substrat classiquement utilisé dans la détection des microorganismes.

La concentration de l'autre substrat enzymatique spécifique est généralement comprise entre 0,01 et 2 g/l. L'homme du métier pourra déterminer facilement une telle concentration en fonction du substrat utilisé.

Le milieu réactionnel peut également comprendre un ou plusieurs éléments en combinaison, tels que des acides aminés, des peptones, des hydrates de carbone, des nucléotides, des minéraux, des vitamines, des antibiotiques, des tensioactifs, des tampons, des sels de phosphate, d'ammonium, de sodium, de métaux. Des exemples de milieux sont décrits dans les demandes de brevet de la Demanderesse, EP 656 421 et WO99/09 207.

Les substrats enzymatiques et milieux réactionnels de l'invention sont donc utiles dans le diagnostic de microorganismes à activité peptidase.

Ainsi, la présente invention a trait également à l'utilisation des substrats chromogéniques enzymatiques, tels que décrits ci-dessus, ou d'un milieu de culture, également décrit ci-dessus, pour la détection chez des micro-organismes d'au moins une activité aminopeptidase.

La présente invention a toujours pour objet l'utilisation des substrats chromogéniques enzymatiques, tels que décrits ci-dessus, ou d'un milieu de culture, également décrit ci-dessus, pour séparer les bactéries à coloration à Gram positif des bactéries à coloration à Gram négatif.

L'invention concerne enfin un procédé pour la détection chez des micro-organismes d'au moins une activité aminopeptidase, ce procédé consiste à :

- disposer d'un milieu de culture, tel que défini précédemment,
- ensemercer le milieu avec un échantillon biologique à tester,
- 5 • laisser incuber, et
- révéler la présence d'au moins une activité aminopeptidase seule ou en combinaison avec au moins une autre activité enzymatique différente.

L'invention concerne aussi un autre procédé pour la différenciation chez des bactéries de leur appartenance aux germes du type Gram positif ou aux germes du type Gram négatif, ce procédé consiste à :

- disposer d'un milieu de culture, tel que défini précédemment,
- ensemercer le milieu avec un échantillon biologique à tester,
- laisser incuber, et
- révéler la présence d'au moins une coloration synonyme de la présence de germe(s) du type Gram négatif.

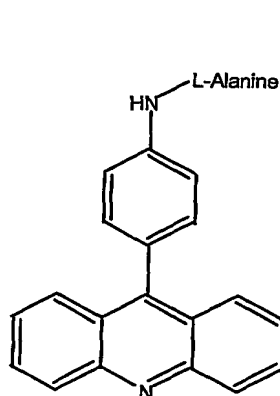
Quel que soit le procédé utilisé, lorsque l'azote en position 10 du groupement acridine n'est pas quaternisé, la révélation de la présence d'au moins une activité aminopeptidase est réalisée par l'ajout d'acide, préférentiellement d'acide chlorhydrique, d'acide acétique ou d'acide citrique, sur la culture. Par quaternisé, il faut comprendre que l'azote en position 10 du groupement acridine est tétravalent, c'est-à-dire qu'il est lié par trois liaisons classiques avec le cycle phényle et une liaison complémentaire avec un radical, de sorte que ledit atome d'azote est porteur d'une charge positive et est donc cationique. Dans ce cas, la molécule est sous la forme d'un sel, par exemple un sel de chlorure, bromure ou trifluoroacétate.

Toutes les réactions, qui vont être décrites ci-dessous dans les exemples, ont été suivies en chromatographie sur couche mince (CCM) et les structures des produits ont été confirmées par spectrométrie de masse (MS) et résonance magnétique nucléaire (RMN).

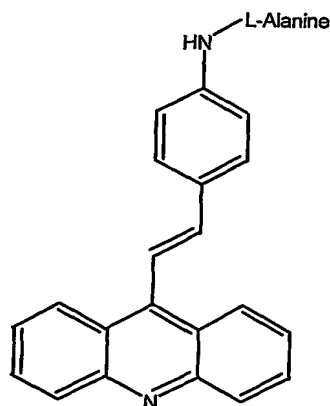
**Exemple 1 : Révélation de l'activité L-Alanine-aminopeptidase de micro-organismes sur milieu gélifié à l'aide de substrats non quaternisés :**

**1.1 : Molécules utilisées :**

On a réalisé une étude comparative de deux substrats à base d'acridine la L-Alanyl-9-(4-aminostyryl)acridine, ci-après référencée L-Ala-4-ASA, et la L-Alanyl-aminophenylacridine (substrats non quaternisés), ci-après référencée L-Ala-APA, de formules respectives :



L-Alanyl-aminophenylacridine



L-Alanyl-9-(4-aminostyryl)acridine

**1.2 : Synthèse des substrats :**

**1.2.1 : Synthèse de la L-Ala-4-ASA :**

Cette synthèse s'effectue en plusieurs étapes.

**Préparation de 9-chloroacridine :**

La préparation est effectuée en utilisant la méthode de Lehmstedt et Schrader qui a été référencée par Albert dans son livre 'The Acridines', Arnold, second edition, (1966), page 33.

**Préparation de 9-méthylacridine**

La méthode de Campbell, Franklin, Morgan et Tivey (réf. *J. Chem. Soc.*, 1958, 1145) a été utilisée. Les rendements ont atteint 90%.

**Préparation de 9-(4-nitrostyryl)acridine par fusion**

Un mélange de 9-méthylacridine (4,83 g, 25,0 mmole), 4-nitrobenzaldéhyde (4,23 g, 31,25 mmole) et chlorure de zinc (5,06 g, 31,25 mmole) est chauffé à 130°C pendant 3 heures avec

un bain d'huile. Le solide récupéré est chauffé dans une solution de sodium metabisulfite pour éliminer l'excès de l'aldéhyde et le mélange chaud est filtré. Des précipités obtenus sont dissous dans une quantité minimum de tétrahydrofurane et de l'eau est ajoutée dans la solution pour avoir le produit sous forme de précipités. Ces précipités sont récupérés par une filtration et séchés. Le produit peut être recristallisé dans l'éthanol. Le rendement est de 35%.

#### Préparation de 9-(4-aminostyryl)acridine

Le produit 9-(4-nitrostyryl)acridine (2,86 g, 10,0 mmole) est dissous dans de l'acétate d'éthyle (250ml), puis porté au reflux. Une solution de chlorure d'étain (II) dihydraté (9,0g, 40mmol) dans de l'éthanol chaud (150ml) est refroidit et ajouté à la solution de 9-(4-nitrostyryl) acridine. L'ensemble est mis à réagir sous reflux et sous agitation pendant 5 heures. Après refroidissement, la 9-(4-aminostyryl)acridine précipite et est isolée par filtration sous vide. Le filtrat est séché par évaporation et repris dans de l'eau (500ml) sous agitation. La solution est alcalinisée (pH 13-14) avec une solution de soude. La fraction de 9-(4-aminostyryl)acridine précédemment isolée qui contient une forte proportion de sel d'étain est également alcalinisée. La 9-(4-aminostyryl)acridine est séparée par filtration, lavée à l'eau et séchée. Elle est suffisamment pure pour l'étape suivante.

#### Préparation de t-Boc-alanyl-9-(4-aminostyryl)acridine

Le produit t-Boc-alanine (3,79 g, 20,0 mmole) est dissous dans une quantité minimum de tétrahydrofurane (THF) anhydride et la solution est refroidie à -15°C à l'aide d'un mélange éthylène glycol/carbone glace dans un bain. La N-méthylmorpholine (NMM) (2,02 g, 20 mmole) est ajoutée goutte à goutte dans le mélange. Le chloroformiate d'isobutyle (IBCF) (2,53 g, 20,0 mmole) est ensuite introduit goutte à goutte dans le mélange réactionnel. Il faut que la température soit au-dessous de -10°C. Au bout de 3 minutes environ, la 9-(4-aminostyryl)acridine (5,4 g, 20 mmole), qui est dissoute dans une quantité minimum de tétrahydrofurane (THF) anhydride et refroidie à -15°C, est introduite. Le mélange réactionnel est agité et on le laisse revenir à la température ambiante. Le sel de N-méthylmorpholine est éliminé par une filtration avec un entonnoir à plaque filtrante. Le mélange est évaporé jusqu'à son quatrième volume original avec un évaporateur rotatif. Le filtrat est introduit goutte à goutte dans un mélange eau/glace en quantité importante sous agitation. Des précipités jaunes,

formés, sont récupérés par une filtration, lavés avec de l'eau et séchés. Le produit peut être recristallisé dans le méthanol. Le rendement est de sensiblement 75 %.

D'autres analogues des acides aminés protégés par le t-Boc ont aussi été utilisés pour former de nouveaux produits. Les acides aminés sont : la proline, la glycine, la sérine et la  $\beta$ -alanine. Les rendements pour ces produits sont dans la zone de 60 à 80 %, les résultats étant  
5 généralement les meilleurs pour les analogues de la  $\beta$ -alanine et les moins bons pour les analogues de la sérine.

#### 1.2.2 : Synthèse de la L-Ala-APA :

La préparation de 9-(4-aminophényl)acridine par une réaction de soufre fondu peut  
10 être réalisée par deux méthodes différentes.

##### Méthode A

L'acridine chlorhydrique (9,7 g, 45,0 mmole), l'aniline (8,37 g, 90,0 mmole) et 10,0 g de soufre sont bien mélangés et chauffés à 130°C pendant 4 heures sous une hotte efficace. Le milieu réactionnel dans le ballon est refroidi à température ambiante et dissous dans le  
15 méthanol chaud pour donner une solution de couleur rouge sanguine. La solution est refroidie et le soufre est éliminé par une filtration. L'alcanilisation du filtrat est réalisée à l'aide d'une solution d'ammoniaque concentrée. Des précipités jaunes légers, formés, sont filtrés puis lavés avec le méthanol froid. Le rendement est de 65%.

##### Méthode B

20 L'acridine (8,06 g, 45,0 mmole), l'aniline chlorhydrique (11,61 g, 90 mmole) et 10,0 g de soufre sont bien mélangés et chauffés à 130°C pendant 4 heures. Le milieu réactionnel est ensuite traité comme dans la Méthode A ci-dessus.

Ensuite on réalise une préparation sur la base de l'une et/ou l'autre des deux méthodes précédentes.

##### 25 Préparation de t-Boc-alanyl-9-(4-aminophényl) acridine

Le produit t-Boc-alanine (3,79 g, 20,0 mmole) est dissous dans une quantité minimum de tétrahydrofurane (THF) anhydride et la solution est refroidie à -15°C à l'aide d'un mélange éthylène glycol/carbone glace dans un bain. La N-méthylmorpholine (NMM) (2,02 g, 20 mmole) est ajoutée goutte à goutte dans le mélange. Le chloroformiate d'isobutyle (IBCF)

(2,53 g, 20,0 mmole) est ensuite introduit goutte à goutte dans le mélange réactionnel. Il faut que la température soit au-dessous de  $-10^{\circ}\text{C}$ . Au bout de 3 minutes environ, la 9-(4-aminophényl)acridine (5,4 g, 20 mmole), qui est dissoute dans une quantité minimum de tétrahydrofurane (THF) anhydride et refroidie à  $-15^{\circ}\text{C}$ , est introduite. Le mélange réactionnel est agité et on le laisse revenir à la température ambiante. Le sel de N-méthylmorpholine est éliminé par une filtration avec un entonnoir à plaque filtrante. Le mélange est évaporé jusqu'à son quatrième volume original avec un évaporateur rotatif. Le filtrat est introduit goutte à goutte dans un mélange eau/glace en quantité importante sous agitation. Des précipités jaunes, formés, sont récupérés par une filtration, lavés avec de l'eau et séchés. Le produit peut être recristallisé dans le méthanol. Le rendement est de 75%.

D'autres analogues des acides aminés protégés par le t-Boc ont aussi été utilisés pour former de nouveaux produits. Les acides aminés sont : la proline, la glycine, la sérine et la  $\beta$ -alanine. Les rendements pour ces produits sont dans la zone de 60 à 80% : les résultats étant généralement les meilleurs pour les analogues de la  $\beta$ -alanine et les moins bons pour les analogues de la sérine.

### 1.3 : Préparation du milieu :

Un milieu gélifié comprenant de la L-Alanyl-9-(4-aminostyryl)acridine (ci-après référencée L-Ala-4-ASA) ou de la L-Alanyl-aminophenylacridine (ci-après référencée L-Ala-APA) est préparé comme suit : 46,37 g d'agar Columbia sont additionnés à 1 litre d'eau distillée puis autoclavés. Ce milieu réactionnel est séparé en deux milieux de volume équivalent. Chacun de ces milieux comprend respectivement : 0,3 g/l de L-Ala-4-ASA apporté par une solution mère dans du DMSO et 0,3 g/l de L-Ala-APA apporté aussi par une solution mère dans du DMSO.

Des micro-organismes issus de la collection de la Demanderesse ont été ensemencés sur chacun des milieux par isolement en trois cadrans à partir d'une suspension à 0,5 McFarland. Les boîtes ont été incubées à  $37^{\circ}\text{C}$  pendant 24 heures. Les colonies formées ont été examinées visuellement après 24 heures d'incubation. La coloration de ces colonies a été notée avant et après ajout d'une goutte d'acide chlorhydrique.

### 1.4 : Résultats :

Les résultats sont présentés dans le tableau 1 ci-dessous. En absence d'HCl, les deux substrats ne donnent pas de coloration spontanée. En présence d'une goutte d'HCl, les colonies possédant l'activité L-Alanine-aminopeptidase sont colorées en gris-mauve à mauve. Les colonies ne possédant pas cette activité demeurent incolores. Ces substrats sont donc sensibles et spécifiques. Ils peuvent permettre dans le cas d'une culture mixte Gram positif et Gram négatif de séparer les deux types de germes.

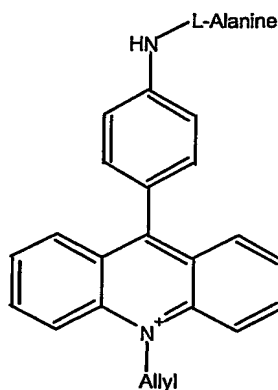
ESPECES (N° souche interne)	0,3 g/l L-Ala-4-ASA sans HCl	0,3 g/l L-Ala-APA sans HCl	0,3 g/l L-Ala-4-ASA avec HCl	0,3 g/l L-Ala-APA avec HCl
<i>Escherichia coli</i>	incolore	incolore	gris mauve	mauve pâle
<i>Proteus mirabilis</i>	incolore	incolore	gris mauve	mauve très pâle pâle
<i>Klebsiella pneumoniae</i>	incolore	incolore	gris mauve	mauve
<i>Enterobacter cloacae</i>	incolore	incolore	gris mauve	mauve
<i>Citrobacter koseri</i>	incolore	incolore	gris mauve	mauve
<i>Streptococcus agalactiae</i>	incolore	incolore	incolore	incolore
<i>Enterococcus faecalis</i>	incolore	incolore	incolore	incolore
<i>Staphylococcus aureus</i>	incolore	incolore	incolore	incolore
<i>Listeria innocua</i>	incolore	incolore	incolore	incolore
<i>Candida albicans</i>	incolore	incolore	incolore	incolore

**Tableau 1 :** Révélation de l'activité L-Alanine-aminopeptidase de micro-organismes par la L-Ala-4-ASA ou la L-Ala-APA sur milieu gélifié

**Exemple 2 :** Révélation de l'activité L-Alanine-aminopeptidase de micro-organismes sur milieu gélifié à l'aide de substrat quaternisé :

**2.1 : Molécule utilisée :**

L'activité L-Alanine-aminopeptidase de micro-organismes sur milieu gélifié est réalisée par l'utilisation du chlorure de L-Alanyl-9(4-aminophenyl)-10-allyl-acridinium (substrat quaternisé), ci-après désigné L-Ala-4-AP-10-AA, de formule :



chlorure de L-Alanyl-9-(4-aminophényl)-10-allyl-acridinium

## 2.2 : Synthèse de L-Ala-4-AP-10-AA :

Le composé de départ est la t-Boc-alanyl-9-(4-aminophényl)acridine dont la  
5 synthèse a déjà été exposée au paragraphe 1.2.2 (Synthèse de L-Ala-APA). Dans un flacon  
de 10 ml qui peut être fermé, la t-Boc-alanyl-9-(4-aminophényl)acridine (0,88 g, 2,0 mmole)  
est introduite dans le tétrahydrofurane anhydride (4,0 ml) et le mélange est mis en l'ébullition  
pour avoir une solution partielle. La solution / suspension est refroidie et le bromure d'allyle  
(2,0 ml) est ajouté. Le flacon est ensuite porté au reflux pendant 8 heures, et la réaction est  
10 régulièrement suivie par chromatographie sur couche mince (CCM). Après refroidissement et  
élimination du solvant, le sel quaternaire est lavé avec de l'éther diéthylique et séché.

Le produit est dissous dans une quantité minimum d'éthanol et agité avec l'acétate  
d'éthyle (10 ml) saturé par HCl. Des précipités, qui sont formés quelques heures après, sont  
récupérés par une filtration sous pression réduite. L'introduction de l'éther éthylique dans le  
15 filtrat permet de récupérer le produit en plus. Les fractions réunies du produit sont lavées avec  
l'éther éthylique et séchées rapidement pour éviter l'absorption d'humidité.

## 2.3 : Préparation du milieu :

Un milieu gélifié comprenant comme substrat du L-Ala-4-AP-10-AA est préparé  
comme suit : 46,37 g d'agar Columbia sont additionnés à 1 litre d'eau distillée puis  
autoclavés. Ce milieu réactionnel est séparé en trois milieux de volume équivalent. Chacun de  
20 ces milieux comprend respectivement : 0,1 g/l, 0,2 g/l, 0,4 g/l de L-Ala-4-AP-10-AA  
apporté par une solution mère dans du DMSO.



Des micro-organismes issus de la collection de la Demanderesse ont été ensemencés sur chacun des milieux par isolement en trois cadrans à partir d'une suspension à 0,5 McFarland. Les boîtes ont été incubées à 37 °C pendant 48 heures. Les colonies formées ont été examinées visuellement après 24 et 48 heures d'incubation. La coloration de ces colonies ainsi que l'intensité de cette coloration ont été notées.

#### 2.4 : Résultats :

Les résultats sont exprimés en intensité de coloration en se basant sur une échelle arbitraire allant de 0 à 4. Ces résultats sont présentés dans le tableau 2 ci-dessous .

Ce substrat permet de révéler une activité L-Alanine-aminopeptidase chez les bactéries à Gram négatif par l'apparition spontanée (sans ajout d'acide) d'une couleur concentrée au niveau des colonies. Les colonies ne possédant pas cette activité demeurent incolores. Ce substrat est donc sensible et spécifique. Il peut permettre dans le cas d'une culture mixte Gram positif et Gram négatif de séparer les deux types de germes. Le fait de « quaterniser » l'azote en position 10 du groupement acridine permet d'obtenir une réaction spontanée sans ajout d'acide comparativement à la même molécule non quaternisée décrite dans l'exemple 1.

SOUCHES	Temps d'incu- -bation	0,1 g/l de L-Ala-4- AP-10-AA		0,2 g/l de L-Ala-4- AP-10-AA		0,4 g/l de L-Ala-4- AP-10-AA	
		Couleur	Intensité	Couleur	Intensité	Couleur	Intensité
<i>Escherichia coli</i> (032)	24 H	beige	0,5	rose-orange	2	rose-orange	2,5
	48 h	beige	0,5	rose-orange	2	rose-orange	3
<i>Proteus mirabilis</i> (103)	24 H	beige	traces	rose-orange	0,5	rose-orange	3
	48 h	beige	traces	rose-orange	1	rose-orange	3
<i>Klebsiella pneumoniae</i> (023)	24 H	beige	traces	rose-orange	1	rose-orange	3
	48 h	beige	traces	rose-orange	2	rose-orange	3,5
<i>Citrobacter koseri</i> (090)	24 H	beige	0,5	rose-orange	1	rose-orange	3
	48 h	beige	0,5	rose-orange	2	rose-orange	3,5
<i>Staphylococcus aureus</i> (070)	24 H	inhibé	-	inhibé	-	inhibé	-
	48 h	inhibé	-	inhibé	-	inhibé	-
<i>Streptococcus pyogenes</i> (067)	24 H	inhibé	-	inhibé	-	inhibé	-
	48 h	incolore	-	incolore	-	incolore	-
<i>Enterococcus faecalis</i> (075)	24 H	incolore	-	orange	traces	orange	traces
	48 h	incolore	-	orange	0,5	orange	1
<i>Listeria innocua</i> (036)	24 H	incolore	-	incolore	-	incolore	-
	48 h	incolore	-	incolore	-	incolore	-
<i>Candida albicans</i> (056)	24 H	incolore	-	incolore	-	incolore	-
	48 h	incolore	-	incolore	-	incolore	-

**Tableau 2 :** Influence de la concentration en substrat dans la révélation de l'activité L-Alanine-aminopeptidase de micro-organismes par désigné la L-Ala-4-AP-10-AA

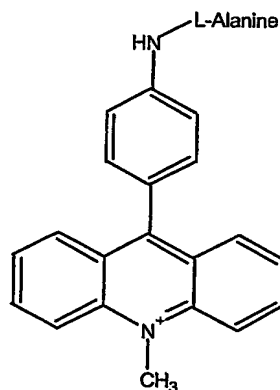
5

**Exemple 3 :** Révélation de l'activité L-Alanine-aminopeptidase de micro-organismes sur milieu gélifié à l'aide d'un autre substrat quaternisé :

### 3.1 : Molécule utilisée :

La révélation de l'activité L-Alanine-aminopeptidase de micro-organismes sur milieu gélifié s'effectue par l'utilisation d'un substrat appelé chlorure de L-Alanyl-9(4-aminophenyl)-10-méthyl-acridinium (substrat quaternisé), ci-après appelé L-Ala-4-AP-10-MA, dont la formule est la suivante :

10



chlorure de L-Alanyl-9(4-aminophenyl)-10-méthyl-acridinium

### 3.2 : Synthèse de L-Ala-4-AP-10-MA :

Cette synthèse a déjà été réalisée au paragraphe 2.2 ci-dessus, dans laquelle le bromure d'allyle a été remplacé par l'iodure de méthyle. Il convient de s'y reporter pour connaître la synthèse de la L-Ala-4-AP-10-MA.

### 3.3 : Préparation du milieu :

Un milieu gélifié comprenant 300 mg/l de L-Ala-4-AP-10-MA, est préparé comme suit : 46,37 g d'agar Columbia sont additionnés à 1 litre d'eau distillée puis autoclavés, le substrat est ensuite apporté par une solution mère dans du DMSO. Des micro-organismes issus de la collection de la Demanderesse ont été ensemencés sur le milieu par isolement en trois cadrans à partir d'une suspension à 0,5 McFarland. Les boîtes ont été incubées à 37 °C pendant 48 heures. Les colonies formées ont été examinées visuellement après 24 et 48 heures d'incubation. La coloration de ces colonies ainsi que l'intensité de cette coloration ont été notées.

### 3.4 : Résultats :

Les résultats sont présentés dans le tableau 3 ci-dessous :

SOUCHES	Temps d'incubation	0,3 g/l de L-Ala-4-AP-10-MA	
		Couleur	Intensité
<i>Escherichia coli</i> (032)	24 H	rose-orange	3,5
	48 h	rose-orange	3,5
<i>Proteus mirabilis</i> (103)	24 H	rose-orange	1
	48 h	rose-orange	2
<i>Klebsiella pneumoniae</i> (023)	24 H	rose-orange	3
	48 h	rose-orange	3
<i>Citrobacter koseri</i> (090)	24 H	rose-orange	3
	48 h	rose-orange	3
<i>Staphylococcus aureus</i> (070)	24 H	inhibé	-
	48 h	inhibé	-
<i>Streptococcus pyogenes</i> (067)	24 H	inhibé	-
	48 h	inhibé	-
<i>Enterococcus faecalis</i> (075)	24 H	rose	traces
	48 h	rose-orange	0,5
<i>Listeria innocua</i> (036)	24 H	incolore	-
	48 h	rose-orange	traces
<i>Candida albicans</i> (056)	24 H	incolore	-
	48 h	incolore	-

Tableau 3 : Révélation de l'activité L-Alanine-aminopeptidase de micro-organismes par de la L-Ala-4-AP-10-AA dont la concentration en substrat est optimisée

5

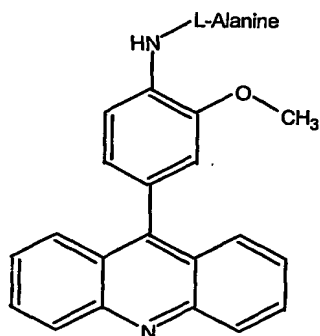
Ce substrat permet de révéler une activité L-Alanine-aminopeptidase chez les bactéries à Gram négatif par l'apparition spontanée (sans ajout d'acide) d'une couleur rose-orange concentrée au niveau des colonies. Les colonies ne possédant pas cette activité demeurent incolores. Ce substrat est donc sensible et spécifique. Il peut permettre dans le cas d'une culture mixte Gram +/Gram - de séparer les deux types de germes. Comparativement au substrat décrit dans l'exemple 2, il semble permettre d'obtenir des intensités de coloration plus fortes pour les souches positives. La différence entre ces deux substrats est le type de groupement en position 10 sur l'azote du noyau d'acridine.

10

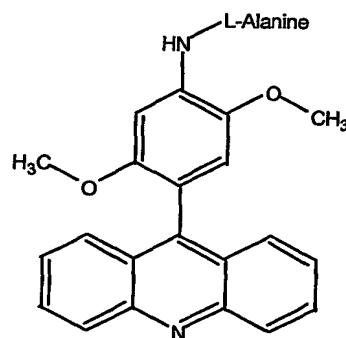
**Exemple 4 : Révélation de l'activité L-Alanine-aminopeptidase de micro-organismes sur milieu gélifié à l'aide d'autres substrats non quaternisés :**

**4.1 : Molécules utilisées :**

La révélation de l'activité L-Alanine-aminopeptidase de micro-organismes sur milieu gélifié s'effectue par l'utilisation de deux substrats appelés L-Alanyl-2-methoxyaminophenylacridine, ci-après appelée L-Ala-2-MeOAPA, et L-Alanyl-2,5-dimethoxyaminophenylacridine, ci-après appelée L-Ala-2,5-diMeOAPA, dont les formules sont respectivement les suivantes :



L-Alanyl-2-methoxyaminophenylacridine



L-Alanyl-2,5-dimethoxyaminophenylacridine

**4.2 : Synthèse des substrats :**

**4.2.1 : Synthèse de L-Ala-2-MeOAPA :**

Sur la base de ce qui est décrit au point 1.2.2 ci-dessus, d'autres analogues d'aniline sont aussi utilisés pour former des nouveaux produits, y compris l'anisidine (3-méthoxyaniline) qui donne la 9-(4-amino-2-méthoxyphényl)acridine.

**4.2.2 : Synthèse de L-Ala-2,5-diMeOAPA :**

Sur la base de ce qui est décrit au point 1.2.2 ci-dessus, d'autres analogues d'aniline sont aussi utilisés pour former des nouveaux produits, y compris la 2,5-diméthoxyaniline qui donne la 9-(4-amino-2,5-diméthoxyphényl)acridine.

**4.3 : Préparation du milieu :**

Un milieu gélifié comprenant de la L-Ala-2-MeOAPA ou de la L-Ala-2,5-diMeOAPA est préparé comme suit : 46,37 g d'agar Columbia sont additionnés à 1 litre d'eau distillée puis autoclavés. Ce milieu réactionnel est séparé en deux milieux de volume équivalent. Chacun de ces milieux comprend respectivement : 0,3 g/l de L-Ala-2-MeOAPA apporté par une solution mère dans du DMSO et 0,3 g/l de L-Ala-2,5-diMeOAPA apporté aussi par une solution mère dans du DMSO. Des micro-organismes issus de la collection de la Demanderesse ont été ensemencés sur chacun des milieux par isolement en trois cadrans à partir d'une suspension à 0,5 McFarland. Les boîtes ont été incubées à 37 °C pendant 24 heures. La coloration de ces colonies ainsi que l'intensité de cette coloration ont été notées après ajout d'HCl.

#### 4.4 : Résultats :

Les résultats sont présentés dans le tableau 4 ci-dessous :

SOUCHES	Temps d'incubation	L-Ala-2- MeOAPA		L-Ala-2,5-di MeOAPA	
		Couleur	Intensité	Couleur	Intensité
<i>Escherichia coli</i> (032)	24 H	orange	0,5	jaune orange	1,5
	48 h	rose	3,5	jaune orange	2
<i>Proteus mirabilis</i> (037)	24 H	orange	1	incolore	0,
	48 h	orange	1,5	orange	0,5
<i>Klebsiella pneumoniae</i> (023)	24 H	rose	3	orange	1
	48 h	rose	3,5	jaune orange	2,5
<i>Citrobacter koseri</i> (012)	24 H	orange	2	orange	1
	48 h	rose	3,5	jaune orange	2,5
<i>Enterobacter cloacae</i> (061)	24 H	rose	2	jaune orange	1,5
	48 h	rose	2	jaune orange	2
<i>Staphylococcus aureus</i> (035)	24 H	incolore*	0	incolore	0
	48 h	incolore*	0	incolore	0
<i>Streptococcus agalactiae</i> (001)	24 H	inhibé	-	incolore	0
	48 h	inhibé	-	incolore	0
<i>Enterococcus faecalis</i> (117)	24 H	inhibé	-	jaune orange	0,5
	48 h	inhibé	-	jaune orange	3
<i>Listeria innocua</i> (036)	24 H	incolore*	0	incolore	0
	48 h	incolore*	0	incolore	0
<i>Candida albicans</i> (077)	24 H	inhibé	-	incolore	0
	48 h	inhibé	-	incolore	0

\* croissance très faible

**Tableau 4 : Révélation de l'activité L-Alanine-aminopeptidase de micro-organismes par les L-Ala-2-MeOAPA et L-Ala-2,5-diMeOAPA**

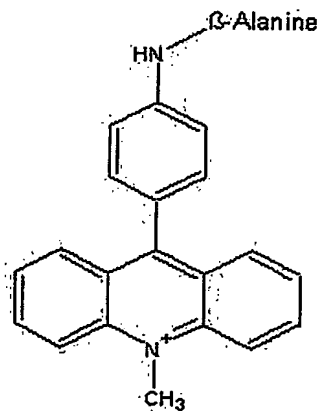
Ces deux substrats permettent après ajout d'une goutte d'HCl de révéler une activité L-Alanine-aminopeptidase chez les bactéries à Gram positif. L'ajout de substituants (Méthoxy-) sur le groupement phényl permet en plus de réduire la toxicité des substrats, notamment vis-à-vis des bactéries à Gram positif. Cependant, ce gain en fertilité se fait au détriment de la spécificité, en effet, *Enterococcus faecalis* présente une activité avec la L-Ala-2,5-diMeOAPA après 48 heures d'incubation.

10

**Exemple 5 : Révélation de l'activité  $\beta$ -Alanine-aminopeptidase de micro-organismes sur milieu gélifié : utilisation du chlorure de  $\beta$ -Alanyl-9(4-aminophenyl)-10-methyl-acridinium (substrat quaternisé) :**

#### 5.1 : Molécule utilisée :

La révélation de l'activité  $\beta$ -Alanine-aminopeptidase de micro-organismes sur milieu gélifié s'effectue par l'utilisation d'un substrat appelé chlorure de  $\beta$ -Alanyl-9(4-aminophenyl)-10-methyl-acridinium (substrat quaternisé), ci-après appelé  $\beta$ -Ala-4-AP-10-MA, dont la formule est la suivante :



20

chlorure de  $\beta$ -Alanyl-9-(4-aminophenyl)-10-methyl-acridinium

#### 5.2 : Synthèse de $\beta$ -Ala-4-AP-10-MA :

Le composé de départ est la t-Boc-alanyl-9-(4-aminophényl)acridine dont la synthèse a déjà été exposée au paragraphe 1.2.2 (Synthèse du L-Ala-APA). La t-Boc-alanyl-9-(4-aminophényl)acridine (0,67 g, 1,5 mmole) est dissoute dans l'acétonitrile (volume minimum) et chauffée au reflux avec de l'iodure de méthyle (4,0 ml). Le flacon est ensuite  
5 fermé et incubé à 40°C pendant plus de 100 heures. Le réactif solide est dissous au fur et à mesure en formant une solution orange. Des cristaux orangés - noirs apparaissent dans cette solution.

A l'issue des 100 heures, le mélange réactionnel est transféré dans l'acétate d'éthyle (100 ml) sous agitation. Après une durée nécessaire, le sel quaternaire est filtré et lavé avec  
10 l'éther diéthylique.

Le produit est dissous dans une quantité minimum d'éthanol et agité avec l'acétate d'éthyle (10 ml) saturé par HCl. Des précipités, qui sont formés quelques heures après, sont récupérés par une filtration sous pression réduite. L'introduction de l'éther diéthylique dans le filtrat permet de récupérer le produit en plus. Les fractions réunies du produit sont lavées avec  
15 l'éther diéthylique et séchées rapidement pour éviter l'absorption d'humidité.

La déprotection est la même que celle décrite précédemment.

### 5.3 : Préparation du milieu :

Un milieu gélifié comprenant 300 mg/l de  $\beta$ -Ala-4-AP-10-MA est préparé comme suit : 46,37 g d'agar Columbia sont additionnés à 1 litre d'eau distillée puis autoclavés, le  
20 substrat est ensuite apporté par une solution mère dans du DMSO. Des micro-organismes issus de la collection de la Demanderesse ont étéensemencés sur le milieu par isolement en trois cadrans à partir d'une suspension à 0,5 McFarland. Les boîtes ont été incubées à 37 °C pendant 48 heures. Les colonies formées ont été examinées visuellement après 24 et 48 heures d'incubation. La coloration de ces colonies ainsi que l'intensité de cette coloration ont  
25 été notées.

### 5.4 : Résultats :

Les résultats sont présentés dans le tableau 5 ci-dessous.

Ce substrat permet de révéler une activité  $\beta$ -Alanine-aminopeptidase chez les bactéries à Gram négatif par l'apparition spontanée (sans ajout d'acide) d'une couleur orange



concentrée au niveau des colonies. Les colonies ne possédant pas cette activité demeurent incolore. Ce substrat est donc sensible et spécifique. Il peut permettre d'identifier les souches de *Pseudomonas aeruginosa* et notamment de les différencier des autres bactéries.

SOUCHES	Temps d'incubation	0,3 g/l de $\beta$ -Ala-4-AP-10-MA	
		Couleur	Intensité
<i>Pseudomonas aeruginosa</i> (052)	24 H	orange	2
	48 h	orange	3
<i>Pseudomonas aeruginosa</i> (165)	24 H	orange	1,5
	48 h	orange	3
<i>Burkholderia cepacia</i> (004)	24 H	incolore	-
	48 h	incolore	-
<i>Pseudomonas fluorescens</i> (016)	24 H	inhibé	-
	48 h	incolore	-
<i>Pseudomonas stutzeri</i> (073)	24 H	inhibé	-
	48 h	incolore	-
<i>Pseudomonas putida</i> (028)	24 H	incolore	-
	48 H	incolore	-
<i>Acinetobacter calcoaceticus</i> (034)	24 H	incolore	-
	48 H	incolore	-
<i>Escherichia coli</i> (032)	24 H	incolore	-
	48 H	incolore	-
<i>Klebsiella pneumoniae</i> (023)	24 H	incolore	-
	48 H	incolore	-

5

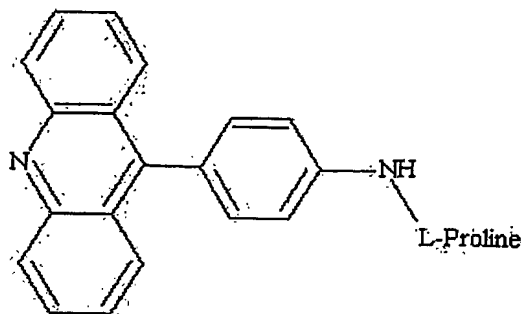
**Tableau 5 :** Révélation de l'activité  $\beta$ -Alanine-aminopeptidase de micro-organismes par de la  $\beta$ -Ala-4-AP-10-MA

**Exemple 6 :** Révélation de l'activité L-Proline-aminopeptidase de micro-organismes sur milieu gélifié à l'aide d'un substrat non quaternisé à base de Proline :

10

**6.1 : Molécule utilisée :**

La révélation de l'activité L-Proline-aminopeptidase de micro-organismes sur milieu gélifié s'effectue par l'utilisation d'un substrat appelé L-Prolyl-9(4-aminophenyl)-acridine (substrat non quaternisé), ci-après appelée L-Pro-4-APA, dont la formule est la suivante :



L-Prolyl-9-(4-aminophenyl)acridine

#### 6.2 : Synthèse de L-Pro-4-APA :

5 Cette synthèse a déjà été réalisée au paragraphe 1.2 ci-dessus, selon deux méthodes A et B, dans lesquelles l'acide aminé Alanine a été remplacé par l'acide aminé Proline. Il convient de s'y reporter pour connaître la synthèse de la L-Pro-4-APA.

#### 6.3 : Préparation du milieu :

10 Un milieu gélifié comprenant de la L-Prolyl-9-(4-aminophenyl)acridine (ci-après référencée L-Pro-4-APA) est préparé comme suit : 45g d'agar Sabouraud sont additionnés à 1 litre d'eau distillée puis autoclavés. Ce milieu réactionnel comprend 0,3 g/l de L-Pro-APA apporté aussi par une solution mère dans du DMSO.

15 Des micro-organismes issus de la collection de la Demanderesse ont étéensemencés sur ce milieu par isolement en trois cadrans à partir d'une suspension à 0,5 McFarland. Les boîtes ont été incubées à 37 °C pendant 24 heures. Les colonies formées ont été examinées visuellement après 24 heures d'incubation. La coloration de ces colonies a été notée avant et après ajout d'une goutte d'acide acétique, ci-après GAA (glacial acetic acid).

#### 6.4 : Résultats :

Les résultats sont présentés dans le tableau 6 ci-dessous :

SOUCHES	Goutte d'Acide Acétique	0,3 g/l de L-Pro -4-APA	
		Couleur	Intensité
<i>Candida albicans</i> (138)	avant GAA	jaune	2
	après GAA	jaune	3
<i>Candida parapsilosis</i> (040)	avant GAA	blanc	-
	après GAA	jaune	2
<i>Candida lusitaniae</i> (045)	avant GAA	pas de croissance	-
	après GAA	pas de croissance	-
<i>Candida guilliermondii</i> (046)	avant GAA	pas de croissance	-
	après GAA	pas de croissance	-
<i>Candida krusei</i> (026)	avant GAA	jaune	1
	après GAA	jaune	3
<i>Candida glabrata</i> (051)	avant GAA	jaune	2
	après GAA	jaune	3

**Tableau 6 : Révélation de l'activité L-Proline-aminopeptidase de micro-organismes par de la L-Pro-4-APA dont la concentration en substrat est optimisée**

5

Avec certaines souches de levures *Candida*, la nature inhibitrice du substrat est démontrée. Cependant, certaines levures produisent une coloration jaune, sans l'addition d'acide. Cette coloration est plus intense pour certaines souches, notamment *Candida albicans*, elle est également plus intense qu'en l'absence de culture. Ceci démontre bien que notre substrat, contenant la Proline comme acide aminé, permet de révéler l'activité L-Proline-aminopeptidase chez les levures.

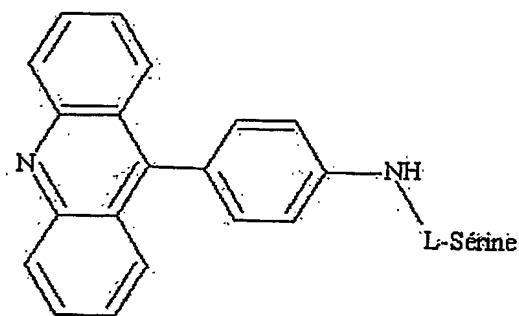
10

**Exemple 7 : Révélation de l'activité L-Sérine-aminopeptidase de micro-organismes sur milieu gélifié à l'aide d'un substrat non quaternisé à base de Sérine :**

15

**7.1 : Molécule utilisée :**

La révélation de l'activité L-Sérine-aminopeptidase de micro-organismes sur milieu gélifié s'effectue par l'utilisation d'un substrat appelé L-Séryl-9(4-aminophenyl)-acridine (substrat non quaternisé), ci-après appelée L-Ser-4-APA, dont la formule est la suivante :



L-Séryl-9(4-aminophenyl)acridine

#### 7.2 : Synthèse de L-Ser-4-APA :

A l'instar de ce qui a été exposé pour la L-Pro-4-APA (paragraphe 6.2 ci-dessus), cette synthèse a déjà été réalisée au paragraphe 1.2 ci-dessus, selon deux méthodes A et B, dans lesquelles l'acide aminé Alanine a été remplacé par l'acide aminé Sérine. Il convient de s'y reporter pour connaître la synthèse de la L-Ser-4-APA.

#### 7.3 : Préparation du milieu :

Un milieu gélifié comprenant de la L-Seryl-9(4-aminophenyl)acridine (ci-après référencé L-Ser-4-APA) est préparé comme suit : 30 milligrammes de L-Ser-4-APA sont ajoutés à 4 grammes d'agar Columbia, additionnés à 0,1 litre d'eau distillée puis autoclavés. Ce milieu réactionnel est mis à l'autoclave à 116°C pendant 20 minutes. La majeure partie du substrat se retrouve en solution, sans coloration résiduelle.

Des micro-organismes issus de la collection de la Demanderesse ont été ensemencés sur ce milieu à partir d'une suspension à 0,5 McFarland. Les boîtes ont été incubées à 37 °C pendant 24 heures. Des échantillons de 10 µl de chaque suspension sont ensuite cultivés pour produire des colonies. Les colonies formées ont été examinées visuellement après 18 à 24 heures d'incubation.

La coloration de ces colonies a été notée avant et après ajout d'une goutte d'acide acétique, ci-après GAA (glacial acetic acid).

#### 7.4 : Résultats :

Les résultats sont présentés dans le tableau 7 ci-dessous :

SOUCHES	GAA	0,3 g/l de L-Ser-4-APA	
		Couleur	Intensité
<i>Escherichia coli</i> (009)	avant GAA	crème	-
	après GAA	orange pâle	2
<i>Klebsiella pneumoniae</i> (012)	avant GAA	crème	-
	après GAA	orange pâle	2
<i>Yersinia enterocolitica</i> (061)	avant GAA	crème	-
	après GAA	orange pâle	2
<i>Candida albicans</i> (138)	avant GAA	crème	-
	après GAA	crème	-
<i>Staphylococcus aureus</i> (008)	avant GAA	crème	-
	après GAA	crème	-
<i>Enterococcus faecalis</i> (117)	avant GAA	crème	-
	après GAA	crème	-

**Tableau 7 :** Révélation de l'activité L-Sérine-aminopeptidase de micro-organismes par de la L-Ser-4-APA dont la concentration en substrat est optimisée

5

Encore une fois, certaines souches ont une inhibition partielle avec le substrat à base d'acridine. Les trois souches à Gram négatif testées produisent une coloration réactionnelle particulière après l'addition d'acide acétique.

**Exemple 8 :** Révélation de l'activité L-alanine-aminopeptidase de micro-organismes sur milieu gélifié à l'aide de substrats quaternisés à base de une, deux ou trois L-alanine :

**8.1 :** Molécule utilisée :

La révélation de l'activité L-alanine-aminopeptidase de micro-organismes sur milieu gélifié s'effectue par l'utilisation de trois substrats, à savoir la L-Ala-4-AP-10-MA telle que décrite dans l'exemple 3, la L-Ala-L-Ala-4-AP-10-MA qui correspond à la L-Ala-4-AP-10-MA comprenant une L-alanine supplémentaire, et la L-Ala-L-Ala-L-Ala-4-AP-10-MA qui possède encore une L-Alanine supplémentaire.

**8.2 :** Synthèse de ces substrats :

Ces substrats ont été préparés comme décrits dans le point 3.2 ci-dessus à partir du composé de départ approprié possédant une, deux ou trois L-Alanines.

#### 8.3 : Préparation du milieu :

5 Un milieu gélifié comprenant ces trois substrats est préparé comme suit : 30 mg de chaque substrat sont dissous (chauffage) dans 10 ml d'eau distillée stérile. Dix ml de cette solution sont ensuite ajoutés à 90 ml d'agar Columbia maintenus en surfusion à 50°C.

Diverses souches de microorganismes issues de la collection NCTC (National Collection of Type Cultures, Colindale, UK) ont étéensemencées sur les milieux ainsi obtenus selon l'inoculation multi-point : pour chaque souche, une goutte de 10µl d'une suspension à 0,5 McFarland est déposée sur chacun des milieux de culture.

10 Les colonies formées ont été examinées visuellement après 24h et 48h d'incubation. La coloration et la croissance de ces colonies ont été notées.

#### 8.4 : Résultats :

Les résultats sont présentés dans le tableau 8 ci-dessous :

SOUCHES (Référence)	L-Ala-4-AP-10-MA		L-Ala-L-Ala-4-AP-10-MA		L-Ala-L-Ala-L-Ala-4-AP-10-MA	
	24h	48h	24h	48h	24h	48h
<i>E. coli</i> O157 (NCTC 12079)	Orange (++)	Orange (++)	Orange (++)	Orange (++)	Orange (++)	Orange (++)
<i>Salmonella typhimurium</i> (NCTC 74)	Orange (++)	Orange (++)	Orange (++)	Orange (++)	Orange (++)	Orange (++)
<i>Salomonella Poona</i> (NCTC 4840)	Orange (++)	Orange (++)	Orange (++)	Orange (++)	Orange (++)	Orange (++)
<i>Shigella sonnei</i> (NCTC 9774)	Orange (++)	Orange (++)	Orange (++)	Orange (++)	Orange (++)	Orange (++)
<i>Pseudomonas aeruginosa</i> (NCTC 10662)	Orange (++)	Orange (++)	Orange (++)	Orange (++)	Orange (++)	Orange (++)
<i>Klebsiella pneumoniae</i> (NCTC 10896)	Orange (++)	Orange (++)	Orange (++)	Orange (++)	Orange (++)	Orange (++)
<i>Enterobacter cloacae</i> (NCTC 11936)	Orange (++)	Orange (++)	Orange (++)	Orange (++)	Orange (++)	Orange (++)
<i>Burkholderia cepacia</i> (NCTC 10743)	Orange (++)	Orange (++)	Orange (++)	Orange (++)	Orange (++)	Orange (++)
<i>Serratia marcescens</i> (NCTC 10211)	Orange (++)	Orange (++)	Orange (++)	Orange (++)	Orange (++)	Orange (++)
<i>Enterococcus faecalis</i> (NCTC 755)	PC	PC	Incolore (++)	Incolore (++)	Incolore (++)	Incolore (++)
<i>Enterococcus faecalis</i> (NCTC 12697)	Incolore (+/-)	Incolore (+/-)	Incolore (++)	Incolore (++)	Incolore (++)	Incolore (++)
<i>Enterococcus faecium</i> (NCTC 7171)	Incolore (++)	Incolore (++)	Incolore (++)	Incolore (++)	Incolore (++)	Incolore (++)
<i>Listeria monocytogenes</i> (NCTC 11994)	Incolore (++)	Incolore (++)	Incolore (++)	Incolore (++)	Incolore (++)	Incolore (++)
<i>Staphylococcus aureus</i> (NCTC 6571)	PC	PC	PC	PC	Incolore (++)	Incolore (++)
<i>Staphylococcus aureus</i> (NCTC 11939)	Incolore (++)	Incolore (++)	Incolore (++)	Incolore (++)	Incolore (++)	Incolore (++)

++ signifie bonne croissance, + signifie croissance modérée, +/- signifie faible croissance et PC signifie pas de croissance

Sur les trois milieux, les souches de bactéries à Gram négatif ont formé des colonies colorées en orange, alors que les souches de bactéries à Gram positif ont formé des colonies incolores ou ne se sont pas développées. Ces trois milieux permettent donc de différencier les bactéries à Gram négatif de celles à Gram positif, et suivant les milieux, la croissance de tout ou partie des souches testées.

**Exemple 9 : Révélation de l'activité Pyroglutamine-aminopeptidase de micro-organismes sur milieu gélifié à l'aide de substrats quaternisés à base de sel de chorhydrate de pyroglutamyl-9-(4-aminophényl)-10-méthyl-acridine :**

**9.1 : Molécule utilisée :**

La révélation de l'activité pyroglutamine-aminopeptidase de micro-organismes sur milieu gélifié s'effectue par l'utilisation de pyroglutamyl-9-(4-aminophényl)-10-méthyl-acridine, ci-après appelée PG-4-AP-10-MA.

**9.2 : Synthèse de ce substrat :**

Ce substrat a été préparé comme décrit dans le point 3.2 ci-dessus à ceci près qu'on a remplacé la L-alanine par la pyroglutamine.

**9.3 : Préparation du milieu :**

Un milieu gélifié comprenant ce substrat est préparé comme suit : 30 mg de chaque substrat sont dissous (chauffage) dans 10 ml d'eau distillée stérile. Dix ml de cette solution sont ensuite ajoutés à 90 ml d'agar Columbia maintenus en surfusion à 50°C.

Diverses souches de microorganismes issues de la collection NCTC (National Collection of Type Cultures, Colindale, UK) ont étéensemencées sur les milieux ainsi obtenus selon l'inoculation multi-point décrite dans l'exemple 8 ci-dessus.

Les colonies formées ont été examinées visuellement après 24h et 48h d'incubation. La coloration et la croissance de ces colonies ont été notées.

**9.4 : Résultats :**

Les résultats sont présentés dans le tableau 9 ci-dessous :



SOUCHE (référence)	PG-4-AP-10-MA	
	24h	48h
<i>Escherichia coli</i> (NCTC 14018)	Incolore (++)	Incolore (++)
<i>Escherichia coli</i> O157 (NCTC 12079)	Incolore (++)	Incolore (++)
<i>Salomonella typhimurium</i> (NCTC 74)	Incolore (++)	Incolore (++)
<i>Salmonella poona</i> (NCTC 4840)	Incolore (++)	Incolore (++)
<i>Shigella sonnei</i> (NCTC 9774)	Incolore (++)	Incolore (++)
<i>Pseudomonas aeruginosa</i> (NCTC 10662)	Incolore (++)	Orange (++)
<i>Klebsiella pneumonia</i> (NCTC 10896)	Incolore (++)	Orange pale (++)
<i>Enterobacter cloacae</i> (NCTC 11936)	Incolore (++)	Orange pale (++)
<i>Burkholderia cepacia</i> (NCTC 10743)	Incolore (++)	Orange pale (++)
<i>Serratia marcescens</i> (NCTC 10211)	Incolore (++)	Orange pale (++)

++ signifie bonne croissance, + signifie croissance modérée, +/- signifie faible croissance et PC signifie pas de croissance

- 5 Le milieu de l'exemple permet de différencier les bactéries exprimant une activité pyroglutamyl-aminopeptidase de celles ne l'exprimant pas.

10 **Exemple 10 : Révélation de l'activité glycine-aminopeptidase de micro-organismes sur milieu gélatiné à l'aide d'un substrat quaternisé à base de sel de chlorhydrate de glycyl-9-(4-aminophényl)-10-méthyl-acridine :**

10.1 : Molécule utilisée :

La révélation de l'activité glycine-aminopeptidase de micro-organismes sur milieu ~~gélatiné~~ s'effectue par l'utilisation de glycyl-9-(4-aminophényl)-10-méthyl-acridine, ci-après appelée G-4-AP-10-MA.

15 10.2 : Synthèse de ce substrat :

Ce substrat a été préparé comme décrit dans le point 3.2 ci-dessus à ceci près qu'on a remplacé la L-alanine par la glycine.

### 10.3 : Préparation du milieu :

Un milieu gélifié comprenant ce substrat est préparé comme suit : 30 mg du substrat sont dissous (chauffage) dans 10 ml d'eau distillée stérile. Dix ml de cette solution sont ensuite ajoutés à 90 ml d'agar Columbia maintenus en surfusion à 50°C.

Diverses souches de microorganismes issues de la collection NCTC (National Collection of Type Cultures, Colindale, UK) ont étéensemencées sur les milieux ainsi obtenus selon l'inoculation multi-point décrite dans l'exemple 8 ci-dessus.

Les colonies formées ont été examinées visuellement après 24h et 48h d'incubation. La coloration et la croissance de ces colonies ont été notées.

### 10.4 : Résultats :

Les résultats sont présentés dans le tableau 10 ci-dessous :

SOUCHE (référence)	G-4-AP-10-MA	
	24h	48h
<i>Escherichia coli</i> (NCTC 14018)	PC	PC
<i>Escherichia coli</i> O157 (NCTC 12079)	Orange (++)	Orange (++)
<i>Salmonella typhimurium</i> (NCTC 74)	Orange pale (++)	Orange pale (++)
<i>Salmonella poona</i> (NCTC 4840)	Orange (++)	Orange (++)
<i>Shigella sonnei</i> (NCTC 9774)	Orange (++)	Orange (++)
<i>Pseudomonas aeruginosa</i> (NCTC 10662)	Orange pale (++)	Orange (++)
<i>Klebsiella pneumonia</i> (NCTC 10896)	Orange (++)	Orange (++)
<i>Enterobacter cloacae</i> (NCTC 11936)	Orange (++)	Orange (++)
<i>Burkholderia cepacia</i> (NCTC 10743)	Orange (++)	Orange (++)
<i>Serratia marcescens</i> (NCTC 10211)	Orange (++)	Orange (++)
<i>Enterococcus faecalis</i> (NCTC 755)	PC	PC
<i>Enterococcus faecalis</i> (NCTC 12697)	Incolore (+)	Incolore (+)
<i>Enterococcus faecium</i> (NCTC 7171)	Incolore (+)	Incolore (+)
<i>Listeria monocytogenes</i> (NCTC 11994)	Incolore (+)	Incolore (+)
<i>Staphylococcus aureus</i> (NCTC 6571)	PC	PC
<i>Staphylococcus aureus</i> (NCTC 11939)	Incolore (+)	Incolore (+)

++ signifie bonne croissance, + signifie croissance modérée, +/- signifie faible croissance et PC signifie pas de croissance

Le milieu de l'exemple permet de différencier les bactéries exprimant une activité glycyamyl-aminopeptidase de celles ne l'exprimant pas.

5     **Exemple 11 : Révélation de l'activité t-BOC-L-alanyl-L-alanyl-L-alanyl-peptidase de micro-organismes sur milieu gélifié à l'aide d'un substrat quaternisé pour lequel l'acide aminé est couplé à un agent de blocage, substrat à base de sel de chlorhydrate de t-BOC-L-alanyl-L-alanyl-L-alanyl-9-(4-aminophényl)-10-méthyl-acridine :**

11.1 : Molécule utilisée :

10     La révélation de l'activité L-alanine-aminopeptidase de micro-organismes sur milieu gélifié s'effectue par l'utilisation de t-BOC-L-alanyl-L-alanyl-L-alanyl-9-(4-aminophényl)-10-méthyl-acridine, ci-après appelée t-BOC-L-Ala-4-AP-10-MA.

11.2 : Synthèse de ce substrat :

15     Ce substrat a été préparé comme décrit dans le point 3.2 ci-dessus à ceci près qu'on n'a pas procédé à la déprotection du composé aminé.

11.3 : Préparation du milieu :

Un milieu gélifié comprenant ce substrat est préparé comme suit : 30 mg du substrat sont dissous (chauffage) dans 10 ml d'eau distillée stérile. Dix ml de cette solution sont ensuite ajoutés à 90 ml d'agar Columbia maintenus en surfusion à 50°C.

20     Diverses souches de microorganismes issues de la collection NCTC (National Collection of Type Cultures, Colindales, UK) ont étéensemencées sur les milieux ainsi obtenus selon l'inoculation multi-point décrite dans l'exemple 8 ci-dessus.

Les colonies formées ont été examinées visuellement après 24h et 48h d'incubation. La coloration et la croissance de ces colonies ont été notées.

25     11.4 : Résultats :

Les résultats sont présentés dans le tableau 11 ci-dessous :

SOUCHE (référence)	t-BOC-L-Ala-Ala-Ala-4-AP-10-MA	
	24h	48h
<i>Escherichia coli</i> O157 (NCTC 12079)	Orange pale (++)	Orange pale (++)
<i>Salomonella typhimurium</i> (NCTC 74)	Orange pale (++)	Orange pale (++)
<i>Salmonella poona</i> (NCTC 4840)	Orange pale (++)	Orange pale (++)
<i>Shigella sonnei</i> (NCTC 9774)	Orange pale (++)	Orange pale (++)
<i>Pseudomonas aeruginosa</i> (NCTC 10662)	Orange pale (++)	Orange pale (++)
<i>Klebsiella pneumonia</i> (NCTC 10896)	Orange (++)	Orange (++)
<i>Enterobacter cloacae</i> (NCTC 11936)	Orange (++)	Orange (++)
<i>Burkholderia cepacia</i> (NCTC 10743)	Orange (++)	Orange (++)
<i>Serratia marcescens</i> (NCTC 10211)	Orange (++)	Orange (++)
<i>Enterococcus faecalis</i> (NCTC 755)	PC	PC
<i>Enterococcus faecalis</i> (NCTC 12697)	Incolore (+/-)	Incolore (+/-)
<i>Enterococcus faecium</i> (NCTC 7171)	Incolore (+/-)	Incolore (++)
<i>Listeria monocytogenes</i> (NCTC 11994)	Incolore (+/-)	Incolore (+)
<i>Staphylococcus aureus</i> (NCTC 6571)	PC	PC
<i>Staphylococcus aureus</i> (NCTC 11939)	Incolore (+)	Incolore (+)

++ signifie bonne croissance, + signifie croissance modérée, +/- signifie faible croissance et PC signifie pas de croissance

5 Le milieu de l'exemple permet d'obtenir quatre groupes de microorganismes :

- ceux formant des colonies colorées en orange franc,
- ceux formant des colonies colorées en orange pâle,
- ceux formant des colonies incolores et
- ceux ne formant pas de colonie.

10 Parmi les souches testées, les bactéries à Gram négatif appartiennent aux deux premiers groupes, alors que les bactéries à Gram positif appartiennent aux deux derniers.

La présence d'un agent de blocage (t-Boc) permet de moduler l'activité par rapport aux résultats obtenus avec le substrat déprotégé (voir exemple 8 ci-dessus).

**Autres expériences réalisées :**

5 D'autres substrats ont été testés qui permettent de valider les résultats présentés ici, on peut par exemple citer :

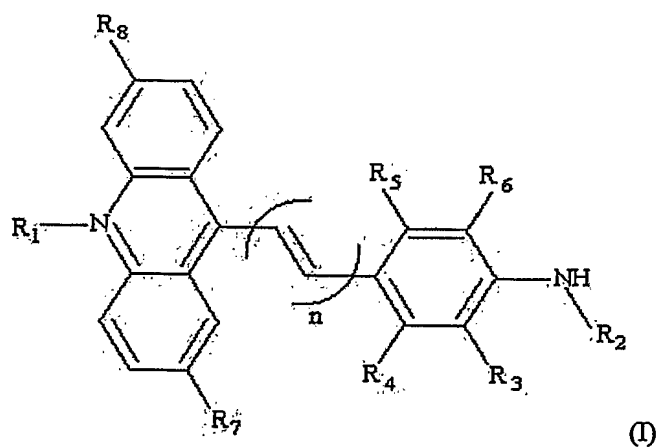
- chlorure de L-Alanyl 9-(4-amino-3-methoxyphenyl)-10-methylacridinium,
- chlorhydrate de chlorure de L-Alanyl 9-(4-aminophenyl)-10-methylacridinium,
- chlorhydrate de chlorure de L-Alanyl 9-(4-amino-2,5-dimethoxyphenyl)-10-methylacridinium,
- 10 • chlorhydrate de chlorure de  $\beta$ -Alanyl 9-(4-aminophenyl)-10-methylacridinium,
- $\beta$ -Alanyl-9-(4-amino-2-methoxy-aminophenyl) acridine,
- $\beta$ -Alanyl-9-(4-amino-2,5-dimethoxy-aminophenyl) acridine,
- chlorhydrate de chlorure de  $\beta$ -Alanyl 9-(4-amino-3-methoxyphenyl)-10-methylacridinium,
- chlorhydrate de chlorure de  $\beta$ -Alanyl 9-(4-amino-2,5-dimethoxyphenyl)-10-methylacridinium.
- 15

De même d'autres espèces de micro-organismes, généralement des bactéries, ont également été testés, telles que :

- *Salmonella typhimurium*,
- *Staphylococcus epidermidis*,
- 20 • *Serratia marcescens*.

## REVENDICATIONS

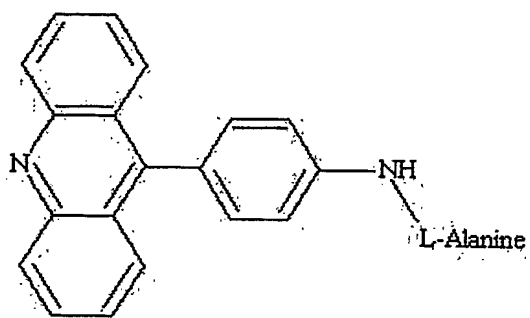
1. Substrats chromogéniques enzymatiques pour la détection chez des micro-organismes d'une activité aminopeptidase ou pour définir l'appartenance d'au moins une bactérie au groupe des Gram positifs ou des Gram négatifs selon sa coloration, caractérisés par le fait qu'ils ont la formule (I) suivante :



dans laquelle :

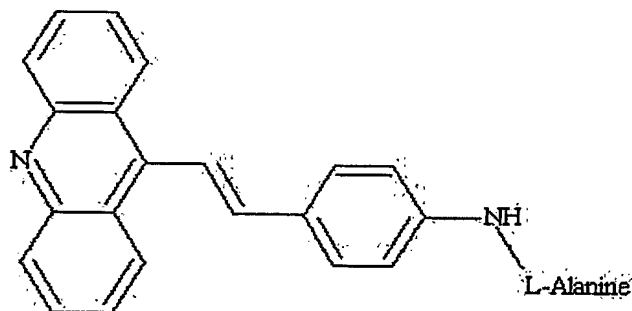
- $R_1$  est rien ou un groupement alkyle, allyle, aryle,
- $R_2$  est constitué par au moins un acide aminé, préférentiellement alanine,
- $R_3$ ,  $R_4$ ,  $R_5$  et  $R_6$  sont constitués indépendamment l'un de l'autre par H ou -O-alkyle, préférentiellement -O-CH<sub>3</sub>,
- $R_7$  est constitué par H, O-CH<sub>3</sub>, alkyle ou halogène,
- $R_8$  est constitué par H ou Cl, et
- $n$  est un chiffre entier correspondant à 0 ou 1.

2. Substrat, selon la revendication 1, caractérisé par le fait qu'il a la formule suivante (Ia) :



(Ia)

ou qu'il a la formule (Ib) suivante :



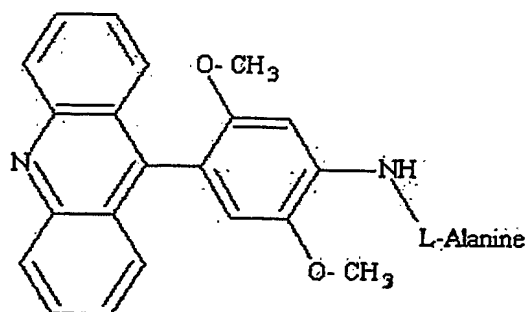
(Ib)

5

3. Substrats, selon la revendication 1, caractérisés par le fait que  $R_1$  est un groupement méthyle ou allyle.

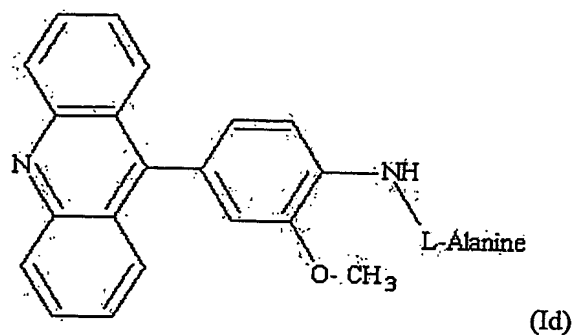
4. Substrats, selon la revendication 1, caractérisés par le fait qu'il a la formule (Ic)

10 suivante :



(Ic)

ou qu'il a la formule (Id) suivante :



5. Substrat selon l'une quelconque des revendications 1 à 4, caractérisé par le fait que R<sub>2</sub> ou la L-alanine est couplé à un agent de blocage.

6. Milieu de culture utilisant au moins un substrat chromogénique enzymatique, selon l'une quelconque des revendications 1 à 5, seul ou en combinaison avec au moins un autre substrat enzymatique spécifique d'une activité enzymatique différente de celle détectée par le substrat selon l'invention.

7. Milieu, selon la revendication 6, caractérisé par le fait qu'il est constitué par un milieu gélifié.

8. Utilisation des substrats chromogéniques enzymatiques, tels que définis dans l'une quelconque des revendications 1 à 5, ou d'un milieu de culture, selon l'une quelconque des revendications 6 ou 7, pour la détection chez des micro-organismes d'au moins une activité aminopeptidase.

9. Utilisation des substrats chromogéniques enzymatiques, tels que définis dans l'une quelconque des revendications 1 à 5, ou d'un milieu de culture, selon l'une quelconque des revendications 6 ou 7, pour séparer les bactéries à coloration à Gram positif des bactéries à coloration à Gram négatif.



10. Procédé pour la détection chez des micro-organismes d'au moins une activité aminopeptidase, caractérisé en ce qu'il consiste à :

- disposer d'un milieu de culture, selon l'une quelconque des revendications 6 ou 7,
- ensemer le milieu avec un échantillon biologique à tester,
- 5   • laisser incuber, et
- révéler la présence d'au moins une activité aminopeptidase seule ou en combinaison avec au moins une autre activité enzymatique différente d'une activité aminopeptidase.

10 11. Procédé pour la différenciation chez des bactéries de leur appartenance aux germes du type Gram positif ou aux germes du type Gram négatif, caractérisé en ce qu'il consiste à :

- disposer d'un milieu de culture, selon l'une quelconque des revendications 6 ou 7,
- ensemer le milieu avec un échantillon biologique à tester,
- laisser incuber, et
- 15   • révéler la présence d'au moins une coloration synonyme de la présence de germe(s) du type Gram négatif.

20 12. Procédé, selon l'une quelconque des revendications 10 ou 11, caractérisé en ce que, lorsque l'azote en position 10 du groupement acridine n'est pas quaternisé, la révélation de la présence d'au moins une activité aminopeptidase est réalisée par l'ajout d'acide, préférentiellement d'acide chlorhydrique, d'acide acétique ou d'acide citrique, sur la culture.

## INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International Application No  
PC 2004/050031A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER  
IPC 7 C07D219/02 C12Q1/04 C12Q1/37

According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC

## B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)  
IPC 7 C07D C12Q

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practical, search terms used)

EPO-Internal

## C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category *	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
A	US 4 457 866 A (GEIGER ROLF ET AL) 3 July 1984 (1984-07-03) column 1, line 57 - column 2, line 68; claims 1,2,4; table 3	1-12
A	FR 2 659 982 A (SERBIO) 27 September 1991 (1991-09-27) claims 1,2	1-12
A	WO 99/38995 A (BIO MERIEUX ; ORENGA SYLVAIN (FR)) 5 August 1999 (1999-08-05) cited in the application claims 1,6,7,9,11,13	1-12
A	WO 98/04735 A (BIO MERIEUX ; ORENGA SYLVAIN (FR)) 5 February 1998 (1998-02-05) cited in the application claims 1,3,7	1-12
-/-		

☒ Further documents are listed in the continuation of box C.☒ Patent family members are listed in annex.

## \* Special categories of cited documents :

- \*A\* document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance
- \*E\* earlier document but published on or after the international filing date
- \*L\* document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)
- \*O\* document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means
- \*P\* document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed

- \*T\* later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention
- \*X\* document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone
- \*Y\* document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art
- \*Z\* document member of the same patent family

Date of the actual completion of the international search

15 June 2004

Date of mailing of the international search report

23/06/2004

Name and mailing address of the ISA

European Patent Office, P.B. 5818 Patentlaan 2  
NL - 2280 HV Rijswijk  
Tel. (+31-70) 340-2040, Tx. 31 651 epo nl,  
Fax: (+31-70) 340-3016

Authorized officer

Schuemacher, A

## INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International Application No  
PCT/JP2004/050031

## C.(Continuation) DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category *	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
A	EP 0 270 946 A (MILES INC) 15 June 1988 (1988-06-15) cited in the application p.16, compound 10 page 15, paragraph 3 - page 16, paragraph 2; claims 1,7	1-12
A	WO 01/09372 A (BAYER AG ; JIANG QINGPING (US); LAW SAY JONG (US); NATRAJAN ANAND (US)) 8 February 2001 (2001-02-08) page 19, line 5 - page 22, line 16; claims 1,2,4	1-12

# INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Information on patent family members

International Application No

PO 2004/050031

Patent document cited in search report		Publication date	Patent family member(s)	Publication date
US 4457866	A	03-07-1984	DE 2936543 A1 AT 7900 T DE 3068208 D1 DK 382880 A EP 0025190 A2 ES 8107310 A1 JP 56055361 A NZ 194869 A YU 229580 A1 ZA 8005560 A	09-04-1981 15-06-1984 19-07-1984 11-03-1981 18-03-1981 16-12-1981 15-05-1981 17-06-1983 31-12-1983 26-08-1981
FR 2659982	A	27-09-1991	FR 2659982 A1 DE 69120359 D1 DE 69120359 T2 EP 0476107 A1 WO 9114787 A1 JP 4506753 T US 5449612 A	27-09-1991 25-07-1996 16-01-1997 25-03-1992 03-10-1991 26-11-1992 12-09-1995
WO 9938995	A	05-08-1999	FR 2774097 A1 AU 759503 B2 AU 2167999 A CA 2318461 A1 EP 1051509 A1 WO 9938995 A1 JP 2002501756 T PL 342028 A1 US 6649365 B1	30-07-1999 17-04-2003 16-08-1999 05-08-1999 15-11-2000 05-08-1999 22-01-2002 07-05-2001 18-11-2003
WO 9804735	A	05-02-1998	FR 2751663 A1 AT 242817 T CA 2231067 A1 DE 69722771 D1 DE 69722771 T2 EP 0880599 A1 ES 2201311 T3 WO 9804735 A1 JP 11512935 T US 6046016 A	30-01-1998 15-06-2003 05-02-1998 17-07-2003 18-03-2004 02-12-1998 16-03-2004 05-02-1998 09-11-1999 04-04-2000
EP 0270946	A	15-06-1988	US 4810636 A AU 8206087 A CA 1303611 C EP 0270946 A2 AT 76068 T AT 142202 T AU 585472 B2 DE 3751896 D1 DE 3751896 T2 DE 3779066 D1 DK 643887 A EP 0459536 A1 ES 2039225 T3 ES 2091267 T3 IE 60183 B1 IL 84666 A JP 1131192 A JP 1929513 C	07-03-1989 09-06-1988 16-06-1992 15-06-1988 15-05-1992 15-09-1996 15-06-1989 10-10-1996 16-01-1997 17-06-1992 10-06-1988 04-12-1991 16-09-1993 01-11-1996 15-06-1994 16-02-1992 24-05-1989 12-05-1995

# INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Information on patent family members

International Application No

P 2004/050031

Patent document cited in search report	Publication date	Patent family member(s)	Publication date
EP 0270946	A	JP 6062569 B NO 875008 A , B, ZA 8709223 A	17-08-1994 10-06-1988 31-08-1988
WO 0109372	A	08-02-2001 AU 6381900 A EP 1203091 A1 JP 2003528938 T WO 0109372 A1	19-02-2001 08-05-2002 30-09-2003 08-02-2001

# RAPPORT DE RECHERCHE INTERNATIONALE

Document internationale No

PC 2004/050031

## A. CLASSEMENT DE L'OBJET DE LA DEMANDE

CIB 7 C07D219/02 C12Q1/04 C12Q1/37

Selon la classification internationale des brevets (CIB) ou à la fois selon la classification nationale et la CIB

## B. DOMAINES SUR LESQUELS LA RECHERCHE A PORTE

Documentation minimale consultée (système de classification suivi des symboles de classement)

CIB 7 C07D C12Q

Documentation consultée autre que la documentation minimale dans la mesure où ces documents relèvent des domaines sur lesquels a porté la recherche

Base de données électronique consultée au cours de la recherche internationale (nom de la base de données, et si réalisable, termes de recherche utilisés)

EPO-Internal

## C. DOCUMENTS CONSIDERES COMME PERTINENTS

Catégorie	Identification des documents cités, avec, le cas échéant, l'indication des passages pertinents	no. des revendications visées
A	US 4 457 866 A (GEIGER ROLF ET AL) 3 juillet 1984 (1984-07-03) colonne 1, ligne 57 - colonne 2, ligne 68; revendications 1,2,4; tableau 3	1-12
A	FR 2 659 982 A (SERBIO) 27 septembre 1991 (1991-09-27) revendications 1,2	1-12
A	WO 99/38995 A (BIO MERIEUX ;ORENGA SYLVAIN (FR)) 5 août 1999 (1999-08-05) cité dans la demande revendications 1,6,7,9,11,13	1-12
A	WO 98/04735 A (BIO MERIEUX ;ORENGA SYLVAIN (FR)) 5 février 1998 (1998-02-05) cité dans la demande revendications 1,3,7	1-12
-/-		

☒ Voir la suite du cadre C pour la fin de la liste des documents

☒ Les documents de familles de brevets sont indiqués en annexe

### \* Catégories spéciales de documents cités:

- \*A\* document définissant l'état général de la technique, non considéré comme particulièrement pertinent
- \*E\* document antérieur, mais publié à la date de dépôt international ou après cette date
- \*L\* document pouvant jeter un doute sur une revendication de priorité ou cité pour déterminer la date de publication d'une autre citation ou pour une raison spéciale (telle qu'indiquée)
- \*O\* document se référant à une divulgation orale, à un usage, à une exposition ou tous autres moyens
- \*P\* document publié avant la date de dépôt international, mais postérieurement à la date de priorité revendiquée

- \*T\* document ultérieur publié après la date de dépôt international ou la date de priorité et n'appartenant pas à l'état de la technique pertinent, mais cité pour comprendre le principe ou la théorie constituant la base de l'invention
- \*X\* document particulièrement pertinent; l'invention revendiquée ne peut être considérée comme nouvelle ou comme impliquant une activité inventive par rapport au document considéré isolément
- \*Y\* document particulièrement pertinent; l'invention revendiquée ne peut être considérée comme impliquant une activité inventive lorsque le document est associé à un ou plusieurs autres documents de même nature, cette combinaison étant évidente pour une personne du métier
- \*Z\* document qui fait partie de la même famille de brevets

Date à laquelle la recherche internationale a été effectivement achevée

15 juin 2004

Date d'expédition du présent rapport de recherche internationale

23/06/2004

Nom et adresse postale de l'administration chargée de la recherche internationale  
Office Européen des Brevets, P.B. 5818 Patentlaan 2  
NL - 2280 HV Rijswijk  
Tel. (+31-70) 340-2040, Tx. 31 651 epo nl,  
Fax: (+31-70) 340-3016

Fonctionnaire autorisé

Schuemacher, A

# RAPPORT DE RECHERCHE INTERNATIONALE

Dem. de Internationale No

PC 2004/050031

## C.(suite) DOCUMENTS CONSIDERES COMME PERTINENTS

Catégorie	Identification des documents cités, avec, le cas échéant, l'indication des passages pertinents	no. des revendications visées
A	EP 0 270 946 A (MILES INC) 15 juin 1988 (1988-06-15) cité dans la demande p.16, compound 10 page 15, alinéa 3 - page 16, alinéa 2; revendications 1,7 -----	1-12
A	WO 01/09372 A (BAYER AG ; JIANG QINGPING (US); LAW SAY JONG (US); NATRAJAN ANAND (US)) 8 février 2001 (2001-02-08) page 19, ligne 5 - page 22, ligne 16; revendications 1,2,4 -----	1-12

# RAPPORT DE RECHERCHE INTERNATIONALE

Renseignements relat

membres de familles de brevets

De de internationale No

PC 2004/050031

Document brevet cité au rapport de recherche		Date de publication	Membre(s) de la famille de brevet(s)	Date de publication
US 4457866	A	03-07-1984	DE 2936543 A1	09-04-1981
			AT 7900 T	15-06-1984
			DE 3068208 D1	19-07-1984
			DK 382880 A	11-03-1981
			EP 0025190 A2	18-03-1981
			ES 8107310 A1	16-12-1981
			JP 56055361 A	15-05-1981
			NZ 194869 A	17-06-1983
			YU 229580 A1	31-12-1983
			ZA 8005560 A	26-08-1981
FR 2659982	A	27-09-1991	FR 2659982 A1	27-09-1991
			DE 69120359 D1	25-07-1996
			DE 69120359 T2	16-01-1997
			EP 0476107 A1	25-03-1992
			WO 9114787 A1	03-10-1991
			JP 4506753 T	26-11-1992
			US 5449612 A	12-09-1995
WO 9938995	A	05-08-1999	FR 2774097 A1	30-07-1999
			AU 759503 B2	17-04-2003
			AU 2167999 A	16-08-1999
			CA 2318461 A1	05-08-1999
			EP 1051509 A1	15-11-2000
			WO 9938995 A1	05-08-1999
			JP 2002501756 T	22-01-2002
			PL 342028 A1	07-05-2001
			US 6649365 B1	18-11-2003
WO 9804735	A	05-02-1998	FR 2751663 A1	30-01-1998
			AT 242817 T	15-06-2003
			CA 2231067 A1	05-02-1998
			DE 69722771 D1	17-07-2003
			DE 69722771 T2	18-03-2004
			EP 0880599 A1	02-12-1998
			ES 2201311 T3	16-03-2004
			WO 9804735 A1	05-02-1998
			JP 11512935 T	09-11-1999
			US 6046016 A	04-04-2000
EP 0270946	A	15-06-1988	US 4810636 A	07-03-1989
			AU 8206087 A	09-06-1988
			CA 1303611 C	16-06-1992
			EP 0270946 A2	15-06-1988
			AT 76068 T	15-05-1992
			AT 142202 T	15-09-1996
			AU 585472 B2	15-06-1989
			DE 3751896 D1	10-10-1996
			DE 3751896 T2	16-01-1997
			DE 3779066 D1	17-06-1992
			DK 643887 A	10-06-1988
			EP 0459536 A1	04-12-1991
			ES 2039225 T3	16-09-1993
			ES 2091267 T3	01-11-1996
			IE 60183 B1	15-06-1994
			IL 84666 A	16-02-1992
			JP 1131192 A	24-05-1989
			JP 1929513 C	12-05-1995



# RAPPORT DE RECHERCHE INTERNATIONALE

Renseignements relat

nombres de familles de brevets

De...de Internationale No

PCT...2004/050031

Document brevet cité au rapport de recherche		Date de publication	Membre(s) de la famille de brevet(s)	Date de publication
EP 0270946	A		JP 6062569 B	17-08-1994
			NO 875008 A ,B,	10-06-1988
			ZA 8709223 A	31-08-1988
WO 0109372	A	08-02-2001	AU 6381900 A	19-02-2001
			EP 1203091 A1	08-05-2002
			JP 2003528938 T	30-09-2003
			WO 0109372 A1	08-02-2001